


**1/1-FAMPAT-©Questel**
**Family Accession Nbr**

20090090690828

**Patent Number**

WO9624367 A1 19960815 [WO9624367]    
**STG:** International publication with international search report





**AP:** 1996WO-NL00038 19960123

CA2211802 A1 19960815 [CA2211802]    
**STG:** Application laid open





**AP:** 1996CA-2211802 19960123

AU4678896 A 19960827 [AU9646788]    
**STG:** Open to public inspection





**AP:** 1996AU-0046788 19960123

NL9500216 A 19960902 [NL9500216]    
**STG:** Patent application laid open





**AP:** 1995NL-0000216 19950206

EP0808168 A1 19971126 [EP-808168]    
**STG:** Application published with search report





**AP:** 1996EP-0902505 19960123

CN1173820 A 19980218 [CN1173820]    
**STG:** Unexamined application for a patent for inv.

**AP:** 1996CN-0191807 19960123





JP10513193 T 19981215 [JP10513193]    
**STG:** Unexam. pat appl. on foreign appl.





**AP:** 1996JP-0524159 19960123

AU712744 B2 19991118 [AU-712744]    
**STG:** Patent preceded by A1

US6284289 B1 20010904 [US6284289]    
**STG:** Granted patent as first publication

**AP:** 1997US-0875661 19971105

EP0808168 B1 20021016 [EP-808168]    
**STG:** Patent specification

AT226081 T 20021115 [ATE226081]    
**STG:** Translation of European patent specification

**AP:** 1996AT-0902505 19960123

DE69624340 D1 20021121 [DE69624340]    
**STG:** Granted EP number in Bulletin

**AP:** 1996DE-6024340 19960123

DK808168 T3 20030217 [DK-808168T]    
**STG:** Translation of European patent specification

**AP:** 1996DK-0902505 19960123

ES2185760 T3 20030501 [ES2185760]   

**STG:** Translation of granted European patent (former B3)




**AP :** 1996ES-0902505 19960123

DE69624340 T2 20030618 [DE69624340]   

**STG:** Trans. of EP patent

CN1121232 C 20030917 [CN1121232C]   

**STG:** Granted patent for invention

JP2008074872 A 20080403 [JP2008074872]   

**STG:** Doc. laid open to publ. inspec.

**AP :** 2007JP-0319836 20071211

**FD :** Division of : JP1996524159 19960123 [1996JP-0524159]

# Title

PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF HERPES

# Other Title

(NL9500216)

Farmaceutische samenstelling voor de behandeling van herpes.

Farmaceutisch præparat til behandlingen af herpes

COMPOSICION FARMACEUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL HERPES.

# Abstract

(US6284289)

A pharmaceutical composition and method for the treatment of herpes simplex infections is disclosed.

The composition contains a quaternary ammonium compound such as cetrimide or benzalkonium chloride and an antiviral agent such as acyclovir, bromoinyldesoxuridine, 3-fluorothymidine, idoxuridine, propyl gallate, proanthocyanides or glucosamine. The compound can also contain a plant extract such as camomile.

# Designated States

(EP-808168)

AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE

# Designated States

(WO9624367)

AL AM AT AU AZ BB BG BR BY CA CH CN CZ DE DK EE ES FI GB GE HU IS JP KE KG KP KR KZ  
LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK TJ TM TR TT UA  
UG US UZ VN AZ BY KG KZ RU TJ TM

ARIPO patent : KE LS MW SD SZ UG

European patent : AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE

OAPI patent : BF BJ CF CG CI CM GA GN ML MR NE

# PCT Patent

(EP-808168)

WO9624367 - 19960815 [WO9624367]

# PCT Patent

(US6284289)

WO96/24367 19960815 [WO9624367]

# PCT Appli.

WONL9600038 0 [1996WO-NL00038]

# PCT Appli.

PCT/NL96/00038 19960123 [1996WO-NL00038]

# PCT Appli.

WONL9600038 19960123 [1996WO-NL00038]

# PCT Appli.

WONL9600038 19960123 [1996WO-NL00038]

# PCT Appli.

WONL9600038 19960123 [1996WO-NL00038]

# PCT Appli.

WONL9600038 19960123 [1996WO-NL00038]

**PCT Appli.**

WONL9600038 19960123 [1996WO-NL00038]

**Filing Details**

(JP2008074872)

Division of : JP1996524159 19960123 [1996JP-0524159]

**Priority Details**

1995NL-0000216 19950206

1996WO-NL00038 19960123

**Inventor(s)**

VAN DEN BERGHE DIRK ANDRE RICH

**Orig. Inventor(s)**

VAN DEN BERGHE DIRK ANDRE RICHARD

**Patent Assignee**

BIO PHARMA SCIENCES BV

DEN BERGHE DIRK ANDRE RICHARD

**Orig. Patent Assignee**

Bio Pharma Sciences B.V.; Julianaplein 10; NL-5211 BC s'-Hertogenbosch (NL)



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 Übersetzung der  
europäischen Patentschrift

51 Int. Cl. 7:  
A 61 K 35/78

67 EP 0 808 168 B 1

10 DE 696 24 340 T 2

- |    |   |                |
|----|---|----------------|
| 21 | Deutsches Aktenzeichen:                               | 696 24 340.7   |
| 66 | PCT-Aktenzeichen:                                     | PCT/NL96/00038 |
| 66 | Europäisches Aktenzeichen:                            | 96 902 505.5   |
| 67 | PCT-Veröffentlichungs-Nr.:                            | WO 96/024367   |
| 68 | PCT-Anmeldetag:                                       | 23. 1. 1996    |
| 67 | Veröffentlichungstag<br>der PCT-Anmeldung:            | 15. 8. 1996    |
| 67 | Erstveröffentlichung durch das EPA:                   | 26. 11. 1997   |
| 67 | Veröffentlichungstag<br>der Patenterteilung beim EPA: | 16. 10. 2002   |
| 41 | Veröffentlichungstag im Patentblatt:                  | 18. 6. 2003    |

30 Unionspriorität:  
9500216

06. 02. 1995 NL

13 Patentinhaber:  
Bio Pharma Sciences B.V., s'-Hertogenbosch, NL

14 Vertreter:  
derzeit kein Vertreter bestellt

84 Benannte Vertragsstaaten:  
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE

72 Erfinder:  
VAN DEN BERGHE, Andre, Dirk, B-9270 Laarne, BE

64 PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNG ZUR BEHANDLUNG VON HERPES

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung von Herpes

Die vorliegende Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung von Herpes.

5

Die Herpes Simplex Infektion auf der Haut verursacht oberflächliche schmerzhaftes Flecken und Bläschen, welche sich schließlich öffnen und dadurch Läsionen verursachen. Herpes wird hauptsächlich durch den Herpes Simplex Virus (HSV) Typ 1, verursacht, kann aber auch das Ergebnis des HSV Typ 2 sein, welcher gewöhnlich Genitalherpes verursacht. Umgekehrt wird Genitalherpes in etwa 30% der Fälle durch HSV 1 verursacht.

10

Infektionen des Mundes werden mit dem Ausdruck Herpes labialis, auch „cold sore“ (Fieberbläschen) genannt, bezeichnet. Andere Bereiche des Gesichtes, wie z.B. Augen und Nase, können auch betroffen sein. Dies wird dann als Herpes simplex des Gesichtes erwähnt. Die Infektion kann sich selbst auch an anderen Stellen des Körpers manifestieren.

15

20

Etwa 70-90% der Bevölkerung ist primär mit HSV infiziert. Diese Menschen sind dann Träger des Virus. Nachdem einmal ein Individuum mit dem HSV infiziert wurde, wird dieses Virus anschließend im Körper latent präsent bleiben. Im latenten Zustand befindet sich der Virus in den Nervenzellkörperchen in den Ganglia. Aufgrund besonderer Reize, wie z.B. einer Grippeinfektion oder anderen Atemwegsstörungen, gastro-intestinalen Infektionen, Stress, Ermüdung, Menstruation, Schwangerschaft, Allergie, Sonnenlicht und Fieber kann der latente Virus aktiviert werden. Er wird von den Ganglia entlang wohl definierter Nervenbahnen zur Hautoberfläche wandern und sich dort vervielfältigen und die Symptome verursachen. Diese wiederkehrende Form des Herpes tritt in

25

30

etwa 40% der infizierten Individuen auf. Eine per se weitgehend harmlose Herpes simplex Infektion kann zu deutlich ernsthafteren Infektionen, wie z.B. Keratitis und Enzephalitis führen. Es ist deshalb bedeutsam, dass die

5 Virusniden an der Infektionsstelle effizient zerstört werden.

Das gegenwärtig am häufigsten verwendete Heilmittel gegen HSV-Infektionen ist Acyclovir, welches z.B. unter dem

10 Markennamen Zovirax verkauft wird. Acyclovir ist ein Guaninanalogen, welches die DNA-Polymerase des Virus behindert und dadurch die virale DNA-Replikation inhibiert. Das Vervielfältigen des Virus wird verhindert, jedoch wird der Virus selbst nicht abgetötet. Der Virus kann sich deshalb

15 in die Ganglia zurückziehen und auf diese Weise erneut zur Latenz führen.

Die Übertragung des HSV-1 erfolgt durch direkten Kontakt über Speichel oder den infizierten Fleck auf der Haut. Diese

20 Übertragung wird auch nicht durch Acyclovir verhindert.

Ein anderes Problem ist das Auftreten von bakteriellen Sekundärinfektionen, wie z.B. Impetigo, hervorgerufen durch Staphylokokken und/oder Streptokokken.

25

In Anbetracht dieser Probleme einer Herpesinfektion, welche damit verbunden sein können oder nicht, gibt es einen offensichtlichen Bedarf für eine pharmazeutische Zubereitung, welche das Auftreten der Latenz wie auch die Übertragung und

30 bakterielle Sekundärinfektionen abschwächen oder sogar verhindern kann.

Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde jetzt herausgefunden, dass eine pharmazeutische Zusammensetzung, die aus einer quaternären Ammoniumverbindung als ein erster Bestandteil und/oder einem antiviralen Wirkstoff als ein zweiter Bestandteil und/oder einem Pflanzenextrakt als ein dritter Bestandteil besteht, wobei die drei Bestandteile zueinander kompatibel sind, in einer pharmazeutisch annehmbaren Basis, die oben angeführten Probleme lösen kann.

- 5
- 10 Um den endlosen Kreislauf von Latenz, Wiederauftreten und der erneuten Latenz des Virus zu durchbrechen, ist es notwendig, den Virus selbst abzutöten. Eine verminderte oder gar keine Latenz kann dadurch im Fall einer primären oder wiedergekehrten Infektion zurückkehren, da der tote Virus
- 15 sich nicht in die Ganglia zurückziehen kann. Der wichtigste Bestandteil der vorliegenden erfindungsgemäßen Zusammensetzung ist deshalb eine viruzidale Substanz, mittels die der Virus abgetötet wird.
- 20 Antivirale Wirkstoffe können in eine Reihe von Kategorien unterteilt werden (Colgate, S.M. & Molyneux, R.J., Bio-active natural products, 410, CRC Press, Inc. (1993)), die mit der Klassifikationsgruppe Ia bis zur Gruppe Vb bezeichnet werden. Erfindungsgemäß wurde jetzt herausgefunden, dass, um gegen
- 25 HSV Infektionen im größtmöglichen Ausmaß vorzugehen, bevorzugt eine oder mehrere Substanzen aus der Gruppe IVb mit einer oder mehreren Substanzen aus der Gruppe Va kombiniert werden müssen. Substanzen aus der Gruppe IVb weisen viruzidale Aktivität auf, während die Verbindungen aus der
- 30 Gruppe Va virusstatische und antivirale Aktivität zeigen. Durch die Kombination der beiden Substanztypen wird die Virusreplikation inhibiert und zudem werden die schon vorhandenen Viren abgetötet.

Um sicherzustellen, dass die sekundäre Infektion der durch die HSV-Infektion verursachten Läsion durch andere Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien, verhindert wird, wird  
5 empfohlen, das entweder der erste Bestandteil und/oder der zweite Bestandteil desinfizierende Eigenschaften besitzt.

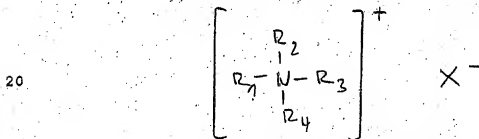
Um die einhergehenden Symptome von Schmerz und Entzündung zu mildern, wird bevorzugt zudem ein Pflanzenextrakt verwendet.  
10 Dieser Extrakt hat zusätzlich zu den entzündungshemmenden Eigenschaften bevorzugt auch eine lindernde Wirkung.

Produkte aus der Gruppe IVb, welche zudem eine desinfizierende Aktivität besitzen und deshalb  
15 erfindungsgemäß in der pharmazeutischen Zusammensetzung verwendet werden können, können in einer dem Fachmann bekannten Weise ausgewählt werden. Gebrauch wird hier von der Endpunkt-Titrationstechnik (EPTT) gemacht, wie durch Colgate & Molyneux (supra. S. 413) beschrieben, mit welcher die  
20 viruzidale Aktivität eines Produktes überprüft werden kann. Die Aktivität wird in der Absenkung des Virustiters ausgedrückt, welche in vitro durch Inkubation einer Herpesvirus-Suspension mit Verdünnungen des zu überprüfenden Produktes bei 37°C für 5 Minuten bestimmt wird. Ein gutes  
25 Produkt wird eine Minimalabsenkung des Virustiters von  $10^3$  ergeben.

Von einem allgemeinen Screening bekannter Desinfektionsmittel auf ihre viruzidale Wirkung gegen Herpes simplex Typ 1 und  
30 Herpes simplex Typ 2 Stämme (klinische Isolate) wurde erfindungsgemäß herausgefunden, dass einige Produkte eine sehr hohe Aktivität, sogar bei 25°C, zeigen. Dies ist sehr vorteilhaft, da die Temperatur auf der Haut im allgemeinen



- niedriger als 37°C und sogar niedriger als 34°C ist. Es wurde herausgefunden, dass die quaternären Ammoniumverbindungen Cetrimid und Benzalkoniumchlorid in einer Konzentration von 50-200 µg/ml und 100-200 µg/ml jeweils eine Titerabsenkung
- 5 von mindestens 10<sup>3</sup> für einen Testzeitraum von 5 Minuten bei 25°C zeigten. Andere bekannte Desinfektionsmittel, wie z.B. Alkohole, Phenole, Peroxide, Biguanide, Aldehyde, Chlorverbindungen etc., zeigten eine Aktivität, welche im Minimum fünfmal niedriger war. Lediglich
- 10 Quecksilberverbindungen und bestimmte Schwermetallverbindungen besitzen eine bessere Aktivität. Aufgrund ihrer starken Toxizität sind diese Verbindungen jedoch nicht für die vorgesehene Verabreichung geeignet.
- 15 Im Prinzip können alle quaternären Ammoniumverbindungen mit der allgemeinen Formel verwendet werden:



- wobei R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> gleich oder verschieden sein
- 25 können und eine aliphatische oder aromatische Gruppe darstellen, wobei mindestens eines von R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> oder R<sub>4</sub> eine aliphatische Kette von 8 oder mehr Kohlenstoffatomen ist;
- wobei X ein anorganisches Anion mit niederem Molekulargewicht oder ein organisches Anion mit hohem
- 30 Molekulargewicht ist. Ein Überblick geeigneter quaternärer Ammoniumverbindungen wird z.B. durch A. Dauphin & J.C. Darbord in „Hygiène hospitalière pratique“, Editions

medicales internationales, Paris (1988) gegeben. Cetrimid wird besonders empfohlen.

- Quaternäre Ammoniumverbindungen sind gut in Wasser und
- 5 Alkohol löslich, können jedoch nicht mit irgendeinem beliebigen anderen Produkt kombiniert werden. Eine wesentliche Anforderung an den zweiten Bestandteil ist deshalb, dass dieser mit dem ersten Bestandteil kompatibel sein muss. Anionische Produkte, Seifen, Nitrate,
- 10 Schwermetalle, oxidierende Produkte, Gummi, Proteine und dergleichen sind nicht mit quaternären Ammoniumverbindungen kompatibel. Solche Produkte sind deshalb nicht zur Verwendung in der Zusammensetzung gemäß der Erfindung geeignet. Der zweite Bestandteil ist bevorzugt nicht teratogen und kann in
- 15 einer hohen Dosierung verabreicht werden, ohne dabei toxisch zu sein. Bevorzugt zeigt der zweite Bestandteil darüber hinaus eine gute Durchdringung der Haut.

- Als zweiter Bestandteil können bekannte antivirale Produkte,
- 20 wie z.B. Acyclovir, BVDU, 3FT, Idoxuridin etc. verwendet werden, soweit sie mit dem ersten Bestandteil kompatibel sind. Zusätzlich können nicht toxische Naturprodukte mit antiviraler Aktivität verwendet werden.

- 25 Die Eignung des zweiten Bestandteils kann gleichermaßen mit einem per se bekannten EPTT Verfahren (Colgate & Molyneux, supra, S. 414) überprüft werden. Gebrauch wird hier von VERO-Zellen gemacht. Erfindungsgemäß wurde somit herausgefunden, dass Gallate in vitro eine gute antivirale Aktivität
- 30 besitzen. Propylgallat in einer Konzentration von 100 µg/ml hat somit einen Faktor der Titerabsenkung von  $10^4$ . In einer Konzentration von 100 µg/ml ist der Faktor der Absenkung der infektiösen Partikel in VERO-Zellen  $10^3$ . Ethylgallat besitzt

einen Absenkungsfaktor von  $10^1$  in einer Konzentration von 100 µg/ml und von  $10^2$  bei 25 µg/ml. Ethylgallat ist deshalb geringfügig weniger aktiv.

- 5 Die Kompatibilität des ersten Bestandteils und des zweiten Bestandteils kann durch Testen eines Gemisches der zwei Bestandteile an HSV-1 ermittelt werden. Es wurde herausgefunden, dass ein Gemisch von Propylgallat und Cetrimid (2:1) in einer Konzentration von 250 µg Propylgallat zu 125 µg Cetrimid noch eine viruzidale Wirkung von  $10^3$  nach einem Testzeitraum von 5 Minuten bei 25°C besitzt. Das gleiche gilt im Fall von Ethylgallat und Cetrimid. Ein Gemisch von Cetrimid und BVDU oder Acyclovir zeigt nach Verdünnung auf 5 µg/ml BVDU oder Acyclovir und 0,1 µg/ml Cetrimid weiterhin in vitro eine antivirale Aktivität.
- 10
- 15

Die pharmazeutische Zusammensetzung enthält zudem bevorzugt einen Pflanzenextrakt, mit welchem der Schmerz und die Wirkungen der Entzündungsreaktion gemildert werden können.

- 20 Hier ist es auch der Fall, dass der Extrakt nicht die Aktivität des ersten und des zweiten Bestandteils beeinträchtigen darf.

- Zu diesem Zweck wurden verschiedene Pflanzenextrakte mit Cetrimid und Propylgallat oder Benzalkoniumchlorid und Propylgallat getestet, um zu sehen, ob die viruzidale Aktivität erhalten bleibt und die Bestandteile kompatibel sind. Es wurde herausgefunden, dass Extrakte der Kamille und von Calendula in vitro verwendbar bleiben. Extrakte von Aloe vera, der Wurzel von Echinaceae, des dreifarbigem Veilchens, Senna, Melisse und/oder Hagedorn sind ebenso in der Lage, die Entzündungsreaktion oder den Schmerz zu mildern, während die viruzidale Aktivität erhalten bleibt.
- 25
- 30

Bestimmte Pflanzenextrakte verursachen jedoch eine deutliche Verringerung der viruzidalen Aktivität einiger quaternärer Ammoniumverbindungen. Es wurde beispielsweise herausgefunden, dass 10% Hamamelis die viruzidale und antibakterielle Aktivität von Benzalkoniumchlorid (0,5%) vollständig aufhebt. Die Aktivität von 0,1% Benzalkoniumchlorid gegen Herpes und Bakterien wird 4 bis 8 mal durch Salbei und Große Klette Extrakt vermindert. Es wurde jedoch gefunden, dass eine Kombination von Cetrimid mit einem zweiten Bestandteil und einem Pflanzenextrakt der Kamille, von Calendula, Salbei, Große Klette und Senna in vitro aktiv gegen den Herpes simplex Virus wie auch gegen Bakterien bleibt.

Die Kompatibilität des zu verwendenden Pflanzenextraktes muss deshalb vorab bestimmt werden. Solch eine Bestimmung liegt innerhalb des Vermögens des Durchschnittsfachmannes.

Geeignete Pflanzenextrakte entstammen beispielsweise Aesculus hippocastanum L; Aloe vera L; Anagallis arvensis L; Anthemis nobilis L; Arctium lappa L; Aristolochia clematitis L; Arnica montana L; Betonica officinalis L; Calendula officinalis L; Capsicum annuum (tetragonum); Carica papaya L; Carlina acaulis L; Caryophyllus aromaticus L; Cynoglossum officinale L; Echinacea angustifolia; Echinacea purpurea L; Eupatorium cannabinum L; Geranium robertianum; Geum urbanum L; Glechoma hederacea L; Hamamelis virginiana L; Hypericum perforatum L; Inula helenium L; Juglans regia L; Juniperus oxycedrus L; Lavandula officinalis; Lawsonia alba L; Lysimachia nummularia L; Lythrum salicaria L; Malva sylvestris; Marrubium vulgare L; Matricaria chamomilla L; Mentha piperita L; Myroxylon balsamum L; Myrtus communis L; Olea europaea L; Prunus amygdalus; Pyrus cydonia L; Quercus robur L; Quillaja

- saponaria; Rubus idaeus L; Salvia officinalis L; Saponaria officinalis L; Smilax officinalis; Solanum dulcamara L; Solidago virga aurea L; Styrax tonkinensis; Styrax benzoides; Styrax benzoin; Symphytum officinale L; Trigonella foenum-graecum L; Tropeolum majus L; Urtica urens L; Urtica dioica L; Viola tricolor L.

- Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung, welche aus einer Kombination von einem oder mehreren quaternären Ammoniumverbindungen mit einer viruzidalen und antiseptischen Aktivität und/oder einem antiviralen Produkt, welches kompatibel mit der quaternären Ammoniumverbindung ist und die Virusreplikation inhibiert, und/oder einem Pflanzenextrakt, welcher gleichermaßen kompatibel mit beiden zuvor erwähnten Produkten ist und die einhergehenden Wirkungen der Herpesinfektion, wie z.B. Schmerz, Jucken, Anschwellen, Kribbeln etc. mildert, besteht, stellt eine Gesamtbehandlung der Herpesinfektion dar. Die viruzidale Aktivität der Zusammensetzung tötet die Viren ab, wodurch Latenz weniger oder überhaupt nicht mehr auftreten wird. Die antivirale Aktivität inhibiert die Virusreplikation und damit die Vervielfältigung des Virus. Die antiseptische Aktivität verhindert bakterielle Sekundärinfektionen. Die entzündungshemmende Aktivität verhindert schließlich die Entzündung und lindert überdies den Schmerz und das Jucken.

- Die Bestandteile der erfindungsgemäßen Zusammensetzung sind bevorzugt in einer pharmazeutisch annehmbaren Basis enthalten. Für die Basis trifft ebenfalls zu, dass sie die Aktivität der drei Bestandteile nicht vermindern darf. Um zu überprüfen, ob eine Basis geeignet ist, kann die viruzidale Aktivität des ersten Bestandteils und die desinfizierende Aktivität bestimmt werden. Die desinfizierende Aktivität wird

beispielsweise in einer innerhalb des Vermögens des Fachmannes liegenden Weise, in einen Zeitraum von fünf Minuten bei 25°C an Gram-negativen Keimen, z.B. von Pseudomonas aeruginosa oder Escherichia coli bestimmt.

5

Beispiele geeigneter Basen sind Polyethylenglykole in verschiedenen Molekulargrößen oder Gemischen davon, Estern von Fettsäuren oder Gemischen davon, egal ob mit emulgierenden und/oder Hautpflegezusätzen vermischt oder nicht. Ebenfalls geeignet sind Gemische von Polyethylenglykolen und/oder Estern von Fettsäuren mit oder ohne die emulgierenden und/oder Hautpflegezusätze.

10

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann die Form eines Puders, einer Suspension, einer Lösung, eines Sprays, einer Emulsion, einer Salbe oder einer Creme annehmen und kann zur örtliche Anwendung eingesetzt werden. Solch eine Zusammensetzung kann zubereitet werden durch Kombinieren (d.h. Mischen, Auflösen etc.) der aktiven Bestandteile in Form einer freien Säure oder eines Salzes mit pharmazeutisch annehmbaren Arzneimittelträgern neutralen Charakters (wie z.B. wässrige oder nicht wässrige Lösungsmittel, Stabilisatoren, Emulgatoren, Detergentien, Additive) und zusätzlich, wo notwendig, Färbemittel, aromatische Substanzen und/oder Aromastoffen. Die Konzentration der aktiven Inhaltsstoffe(s) in einer pharmazeutischen Zusammensetzung kann zwischen 0,001% und 100% (w/v), in Abhängigkeit von der Natur der Behandlung und der Art der Anwendung, variieren. Eine Salbe wird empfohlen.

30

Die erfindungsgemäße Zusammensetzung enthält beispielsweise 10-90% einer nicht wässrigen Basis, 1-20% eines Alkohols, 0,1-5% einer oder mehrerer quaternärer Ammoniumverbindungen

und/oder 0,01-2% eines oder mehrerer antiviraler Wirkstoffe  
und/oder 0,5-10% eines oder mehrerer Pflanzenextrakte. Die  
Menge des verwendeten Pflanzenextraktes ist streng auf die  
Aktivität desselben und auf die Konzentration der aktiven

5 Bestandteile im Extrakt bezogen.

Eine bevorzugte erfindungsgemäße Zusammensetzung enthält 20-  
60%, bevorzugt 52% PEG 400, 10-40%, bevorzugt 26% PEG 4000,  
2-20%, bevorzugt 9% Glycerol, 0,5-1,8, bevorzugt 1% Cetrimid,  
10 0,2-3%, bevorzugt 1% Cetylalkohol, 5-15%, bevorzugt 8%  
Kamillenextrakt und 0,2-1%, bevorzugt 0,25% Propylgallat.

Die vorliegende Erfindung wird unter Bezug auf die  
beigefügten Beispiele, welche jedoch nicht gedacht sind, die

15 Erfindung in irgendeiner Weise einzuschränken, weiter  
erklärt.

### Beispiele

#### 20 Beispiel 1

#### I. Zubereitung der gegen Herpes gerichteten Zubereitung

Mit den folgenden Inhaltsstoffen:

25	A.	Polyethylenglykol 400	52%
		Polyethylenglykol 4000	26%
		Glycerol	9%
		Cetrimid	1%
		Cholinchlorid (gegebenenfalls)	2%
30		Cetylalkohol	1%
	B.	Kamillenextrakt	8%
		Propylgallat	1%

wurde eine Salbe durch Aufschmelzen der Inhaltsstoffe unter A bei 75°C und Auflösen der Inhaltsstoffe unter B zubereitet. Das nach Aufschmelzen erhaltene Gemisch der Inhaltsstoffe unter A wurde nachfolgend, während es langsam abkühlte, homogen vermischt und das Gemisch von B wurde hinzugefügt, bevor sich das Gemisch von A sich verfestigte. Das Vermischen wurde anschließend fortgesetzt, bis das Gesamtgemisch vollständig abgekühlt war. Das Gemisch wurde als 93J12 bezeichnet.

10

Polyethylenglycol 400 und 4000 wurden von Pharmaceuticals erhalten, welches diese unter den Handelsnamen Macrogol 400 - Purna und Macrogol 4000 vermarktet. Das Glyzerol war von p.a. Qualität und kam von Merck (4094), Cetrimid A 11936 wurde durch Pharmachemic NV geliefert, Cholinchlorid (C1879) durch Sigma. Cetylalkohol wird unter dem Markennamen Lanette 16 durch Henkel KGaA vermarktet. Der flüssige Kamillenextrakt kam von Conforma und Propylgallat P3130 von Sigma.

## 20 II. Zubereitung und Zusammensetzung des M-VDB Mediums

Mit den folgenden Inhaltsstoffen

	Natriumchlorid (NaCl)	6,77 g
25	D-Galaktose	0,80 g
	Natriumpyruvat	0,20 g
	Kaliumchlorid (KCl)	0,40 g
	Magnesiumchlorid ( $MgCl_2 \cdot x \cdot 6H_2O$ )	2,0 g
	Kalziumchlorid ( $CaCl_2 \cdot x \cdot 2H_2O$ )	0,20 g
30	Natriumdihydrogenphosphat ( $NaH_2PO_4 \cdot x \cdot H_2O$ )	0,14 g
	Natriumsuccinat	1,0 g
	Bernsteinsäure	0,75 g
	L-Glutamin (+)	0,30 g



- |   |  |       |
|---|--|-------|
|   | Aminosäuren BME 1000 x                       | 10 ml |
|   | Vitamine BME 100 x                           | 10 ml |
|   | Phenolrot Stocklösung                        |       |
|   | (d.h. 1% Phenolrot in einer wässrigen Lösung |       |
| 5 | von 0,05 N NaOH)                             | 1 ml  |

- wurde ein Erhaltungsmedium für Zellkulturen zubereitet durch Auflösen von allem in 960 ml destilliertem Wasser, nachfolgendem Einstellen des pH auf 7,4 mit NaOH (10 N) und
- 10 Filtrieren zur Sterilisation durch einen 0,2 µ Membranfilter. Anschließend wurde 2% Neugeborenen Kalb Serum (für VERO Zellen) oder 2% fetales Kalbserum (für andere Zellen) hinzugefügt.

## 15 Beispiel 2

### Antivirale Aktivität

#### 1. Antivirale Aktivität der Bestandteile

- 20 In diesem Beispiel wurde von VERO Zellen Gebrauch gemacht, welche aus der American Type Culture Collection (Accession No. CCL 26) stammen. Die VERO Zellen wurden im Medium 199 (Gibco) mit Earle's Salzen und 5% Kalbserum kultiviert. Als
- 25 Virusquelle wurde der Herpes simplex Virus 1 (HSV-1, charakterisiertes klinisches Isolat) verwendet, welcher in M-VDB mit 100 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2% Kalbserum kultiviert wurde.
- 30 Auf einer Monoschicht von VERO Zellen, die in Mikrotiterplatten (96 Vertiefungen mit flachem Boden) kultiviert wurden, wurden 100 µg/ml einer Verdünnungsserie von  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  des HSV-1 in M-VDB angesetzt. Dem Virus

wurde für 60 bis 90 Minuten gestattet, sich an die Zellen zu adsorbieren. Eine Verdünnungsserie des Testproduktes in M-VDB wurde anschließend zu den infizierten Zellen hinzugefügt. Um die Zytotoxizität des Produktes zu kontrollieren, wurden die

5 Verdünnungen der Produkte gleichermaßen zu nicht infizierten Zellen hinzugefügt. Nach der Inkubation bei 37°C in einer Feuchtkammer für 5 Tage wurde die zytopathogene Wirkung (CPE) mikroskopisch beurteilt.

- 10 Die antivirale Aktivität des Produktes wird als der Absenkungsfaktor (RF) der höchsten nicht toxischen Konzentration der Probe ausgedrückt. Der Absenkungsfaktor (RF) ist das Verhältnis der Viruskonzentration in der Kontrolle verglichen mit der Konzentration des lebenden Virus
- 15 in den Produktverdünnungen. Ein RF von  $\geq 10^2$  wird als signifikant betrachtet. Die Ergebnisse des Experimentes mit Propylgallat werden in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

<u>Testprodukt</u>	<u>Testkonzentration</u>	<u>Absenkungsfaktor</u> <u>Virustiter</u>
Propylgallat in DMSO gelöst und in M-VDB verdünnt	100 µg/ml	$10^4$
dasselbe	50 µg/ml	$10^4$
dasselbe	25 µg/ml	$10^3$
dasselbe	10 µg/ml	1

Aus dem Obigen ist ersichtlich, dass die antivirale Aktivität von Propylgallat für HSV-1 noch bis zu einer Konzentration von 25 µg/ml signifikant ist.

- Die viruzidale Aktivität wurde durch Vermischen der Virussuspensionen, enthaltend  $10^6$  cfu HSV-1, mit einem gleichen Volumen der Testproduktlösungen in verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Dieses Gemisch wurde für eine bestimmte Zeit bei kontrollierter Temperatur inkubiert. Eine Verdünnungsserie von  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  jedes Gemisches wurde auf eine Monoschicht der VERO Zellen platziert. Nach Inkubation für 5 Tage bei  $37^\circ\text{C}$  wurde die CPE beurteilt. Das Ergebnis wurde in RF ausgedrückt. Erneut wurde eine Titerabsenkung von  $\geq 10^5$  als signifikant betrachtet.

Die Ergebnisse der viruzidalen Aktivität in Bezug auf HSV-1 bei  $34^\circ\text{C}$  für 15 Minuten werden in Tabelle 2 gezeigt.

15 Tabelle 2

<u>Testprodukte</u>	<u>Testkonzentration</u>	<u>Absenkungsfaktor</u>
Propylgallat	500 µg/ml	1
Cetrimid	500 µg/ml	$10^5$
	250 µg/ml	$10^5$
	125 µg/ml	$10^5$
	100 µg/ml	$10^5$
	50 µg/ml	10
	10 µg/ml	1
Propylgallat/Cetrimid (2/1)	500/250	$10^5$
Propylgallat/Cetrimid (2/1)	250/125	$10^5$

Aus dem Obigen ist ersichtlich, dass Propylgallat keine viruzidale Aktivität zeigt und dass Cetrimid eine viruzidale Aktivität bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml besitzt.

- Das Gemisch von Propylgallat und Cetrimid bewahrt seine viruzidale Aktivität trotz eines Überschusses an Propylgallat (2/1).

## 2. Antivirale Eigenschaften des Testgemisches

- 10 In gleicher Weise wurde die antivirale Aktivität des in Beispiel 1 zubereiteten Testgemisches bestimmt. Die Ergebnisse der viruzidalen Aktivität der Salbe bei 25°C für 15 Minuten werden in Tabelle 3 gezeigt.
- 15 Tabelle 3 zeigt, dass die Salbe noch viruzidale Aktivität in bezug auf HSV-1 bis zu einer Verdünnung von 1/100 bei 25°C zeigt. Das Cetrimid bewahrt somit seine volle Aktivität, sogar bei 25°C.

### 20 Tabelle 3

<u>Testgemisch</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>RF</u>
93J12	1/2	10 <sup>5</sup>
	1/4	10 <sup>5</sup>
	1/8	10 <sup>5</sup>
	1/16	10 <sup>5</sup>
	1/32	10 <sup>5</sup>
	1/64	10 <sup>5</sup>
	1/128	10 <sup>5</sup>
	1/256	1

Beispiel 3Antibakterielle Aktivität

- 5 Die antibakterielle Aktivität der getrennten Bestandteile wie auch des Endproduktes wurde mit den Testorganismen Candida albicans (ATTC 10231), Escherichia coli (ATTC 8739), Pseudomonas aeruginosa (ATTC 15442) und Staphylococcus aureus (ATTC 6538) bestimmt. Die verwendeten Medien waren Tryptische Sojabrühre (TSB), Tryptischer Sojaagar (TSA) und steriler Phosphatpuffer (PBS).

I. Antibakterielle Aktivität der Bestandteile und Gemische

- 15 Um die minimal inhibierende Konzentration (MIC) zu bestimmen, wurde eine Übernachtskultur jedes Mikroorganismus in TSB bei 37°C zubereitet. Eine 1/2 Verdünnungsserie der verwendeten Testprodukte wurde gleichermaßen in TSB gemacht. 100 µl jeder Verdünnung wurden in einer Mikrotiterplatte platziert. Die Übernachtskulturen wurden 1/1000 in TSB verdünnt. Von jeder bakteriellen Suspension wurden gleichermaßen 100 µl zu den Produktverdünnungen hinzugefügt. Als Kontrollen für die Sterilität wurden Produktverdünnungen ohne Zugabe von Bakterien und Bakterienverdünnungen ohne Zugabe von Produktverdünnungen verwendet. Die Mikrotiterplatten wurden für 24 Stunden bei 37°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Das Bakterienwachstum wurde auf Basis der Trübung der Suspension beurteilt. Der MIC Wert ist die niedrigste Produktkonzentration, die das normale Wachstum eines Mikroorganismus verhindern kann, d.h., die nicht zu irgendeiner Trübung führt.

Die Ergebnisse werden in Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4

Testprodukt %	<u>Candida</u> <u>albicans</u>	<u>Escherichia</u> <u>coli</u>	<u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u>	<u>Staphylo-</u> <u>coccus</u> <u>aureus</u>
Kamillenextrakt (v/v)	> 25%	> 25%	> 25%	12,5%
Propylgallat (w/v)	> 0,2%	0,05%	0,1%	0,2%
Cetrimid (w/v)	0,001%	0,003%	0,003%	0,0005%
Kamille 10% + Cetrimid 0,5%	-	1/128	-	-
Kamille 5% + Propylgallat 0,2% + Cetrimid 0,5%	1/512	1/128	1/128	1/1024

- 5 Das Obige zeigt, dass der Kamillenextrakt eine sehr beschränkte antibakterielle Aktivität im Bezug auf einige Mikroorganismen und nur in hohen Konzentrationen besitzt. Propylgallat und Cetrimid auf der anderen Seite besitzen eine signifikante antibakterielle Aktivität. Es wurde gefunden,
- 10 dass Cetrimid seine antibakterielle Aktivität in den Gemischen bewahrt.

## II. Antibakterielle Aktivität der Testsalbe

- 15 Drei getrennte Portionen der Salbe wurden zubereitet, wie in Beispiel 1 beschrieben, welchen die Lot-Nummern 94A12, 94D21 und 94E05 gegeben wurden. Als Placebo wurde die gleiche Zusammensetzung zubereitet, jedoch unter Weglassung des Cetrimids. Das Placebo wird mit 94D27 bezeichnet. Als

Kontrolle wurde 1% Cetrimid in steril destilliertem Wasser verwendet. Alle Testproben wurden bei Raumtemperatur gelagert.

5 Iia: Bestimmung der minimal inhibierenden Konzentration (MIC).

Die minimal inhibierende Konzentration ist jene Konzentration des Testproduktes, unterhalb der die Bakterien nicht länger wachsen werden. Die verwendete höchste Testkonzentration (1/10 Verdünnung) wurde zubereitet durch Suspendieren von einem Gramm der Salbe in 9 ml steril destilliertem Wasser. Die Verdünnungen wurden zu den Bakterien hinzugefügt, welche anschließend für 24 Stunden kultiviert wurden. Die verwendeten Testorganismen waren Candida albicans (Ca), in einer Menge von  $10^5$ ,  $10^6$  Escherichia coli (Ec),  $10^5$  Pseudomonas aeruginosa (Pa) und  $10^6$  Staphylococcus aureus (Sa).

20. Tabelle 5 zeigt die Verdünnung, in welcher das Wachstum der Bakterien inhibiert wird.

Tabelle 5

Testgemisch	Ca	Ec	Pa	Sa
94A12	1/80	1/160	1/40	1/5120
94D21	1/80	1/160	1/40	1/5120
94D27	> 1/20	> 1/20	> 1/20	> 1/20
94E05	1/80	1/160	1/40	1/5120
Cetrimid 1%	1/80	1/320	1/40	1/5120

25

Die Tabelle zeigt, dass alle Testsalben ihre antibakteriellen Aktivitäten bewahren. Der MIC dieser Salben ist

vergleichbar mit dem MIC Wert von 1% Cetrimid in Wasser. In den überprüften Konzentrationen besitzt das Placebo keine antibakterielle Aktivität..

5 IIb. Bestimmung der bakteriziden und fungiziden Aktivität

- Die bakterizide Aktivität wird mit Candida albicans ( $10^5$ ), Escherichia coli ( $10^6$ ), Pseudomonas aeruginosa ( $10^5$ ) und Staphylococcus aureus ( $10^6$ ) geprüft. Die bakterizide Aktivität wird bestimmt in Übereinstimmung mit den Spezifikationen der Europäischen Pharmakopöe. Diese verlangen, dass das Produkt zum Testen mit dem Mikroorganismus vermischt und für eine Zeit inkubiert wird, woran anschließend dieses Gemisch verdünnt wird und ermittelt wird, bei welcher der Konzentrationen das Bakterienwachstum noch auftritt.

- Eine Verdünnung wurde für jeden Mikroorganismus bis zu einer Endkonzentration von  $10^6$ - $10^7$  cfu zubereitet. Die Salben werden unverdünnt und in einer 1/2 und 1/10 Verdünnung in sterilem Wasser geprüft. Zu einem Gramm der Salbe oder seiner Verdünnung wurden 100 µl eines verdünnten Inokulums hinzugefügt und vermischt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 25°C wurde eine 1/10 Verdünnungsserie in TSB (Tryptische Sojabrühre (Gibco)) aus 100 mg dieses Gemisches zubereitet. Jede Verdünnung wurde auf TSA (Tryptischer Sojaagar (Gibco)) ausplattiert. Die Platten wurden für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen wurden eine unbehandelte Kultur der Mikroorganismen und 1% Cetrimid in destilliertem Wasser Aktivität verwendet. Nach Inkubation wurden alle Platten hinsichtlich des Wachstums beurteilt. Die im Absenkungsfaktor (Rf) zum Ausdruck kommenden Untersuchungen wurden dreimal ausgeführt. Die Ergebnisse werden in Tabelle 6 gezeigt.



Tabelle 6

Testgemisch	Ca(10 <sup>6</sup> )	Ec(10 <sup>6</sup> )	Pa(10 <sup>5</sup> )	Sa(10 <sup>5</sup> )
1/1	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>
94A12 1/2	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>
1/10	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>
1/1	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>
94D21 1/2	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>
1/10	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>
1/1	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>3</sup>	1	-10
94D27 1/2	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>3</sup>	1	-10
1/10	-1	-1	1	1
1/1	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>
94E05 1/2	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>
1/10	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>
1/1	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>
Cet 1% 1/2	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>
1/10	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>	-10 <sup>5</sup>	-10 <sup>6</sup>

- 5 Die obige Tabelle zeigt, dass alle Testsalben ebenso ihre bakterizide Aktivität in den Verdünnungen bewahren. Alle Bakterien wurden abgetötet. Es wurde gefunden, dass das Placebo eine sehr beschränkte bakterizide Aktivität besitzt.

#### 10 Iic. Fungizide Aktivität

Um die fungizide Aktivität zu bestimmen, wurden die Testorganismen Epidermophyton floccosum (RV 69635) und Trichophyton rubrum (RV58124) verwendet.

15

Die fungizide Aktivität wurde in der gleichen Weise wie die bakterizide Aktivität bestimmt.

- Zu diesem Zweck wurde eine Verdünnung jedes Mikroorganismus bis zu einer Endkonzentration von  $10^4$ - $10^5$  cfu zubereitet. Die Salben wurden unverdünnt und in einer 1/2 und 1/10 Verdünnung in sterilem Wasser geprüft. Zu einem Gramm der Salbe oder seiner Verdünnung wurden 100 µl eines verdünnten Inokulums hinzugefügt und vermischt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 25°C wurde eine 1/10 Verdünnungsserie in SAB (Sabouraud Bouillon (Gibco)) aus 100 mg dieses Gemisches zubereitet.
- Jede Verdünnung wurde auf SABA (Sabouraud Agar (Gibco)) ausplattiert. Die Platten wurden für 5 Tage bei 25°C inkubiert. Als Kontrollen wurden eine unbehandelte Kultur der Mikroorganismen und 1% Cetrinid in destilliertem Wasser verwendet. Nach Inkubation wurden alle Platten hinsichtlich des Wachstums beurteilt. Die Tests wurden dreimal ausgeführt. Die Ergebnisse, ausgedrückt im Absenkungsfaktor (Rf), werden in Tabelle 7 gezeigt.

Tabelle 7

Testgemisch	Epidermophyton floccosum ( $10^3$ )	Trichophyton rubrum ( $10^4$ )
94A12	$10^2$	$10^4$
94D21	$10^2$	$10^4$
94D27	$10$	$10^2$
94E05	$10^2$	$10^4$
Cetrinid 1%	$10^2$	$10^4$

- Die obige Tabelle zeigt, dass die Testsalben ihre fungizide Aktivität bewahren, welche vergleichbar ist mit jener von 1% Cetrinid in destilliertem Wasser. Das Placebo besitzt eine beschränkte fungizide Aktivität.

IID. Viruzidale Aktivität

- Die viruzidale Aktivität wurde nach dem durch D. Vanden Berghe et al. in „Methods in Plant Biochemistry“, Bd. 6
- 5 “Assays for Bioactivity“, S. 49-67, Academic Press Limited 1991 beschriebenen Mikroverfahren bestimmt. Zu 300 µl Produktverdünnungen wurde 300 µl unverdünnte Virussuspension hinzugefügt. Diese Gemische wurden für 15 Minuten bei 34°C inkubiert. Verdünnungsröhrchen wurden mit 0,9 ml abgekühltem
- 10 Kulturmedium für den Virus bereitgestellt und in einem Eisbad platziert. 100 µl der inkubierten Gemische wurden in die Verdünnungsröhrchen platziert. Eine 1/10 Verdünnungsserie wurde davon zubereitet. 200 µl dieser Verdünnungen wurden auf die VERO Zellen platziert. Kontrollen waren unbehandelte
- 15 Viren (= Viruskontrolle) und unbehandelte Zellen (= Zellkontrolle). Die Platten wurden bei 37°C in einem Feuchtinkubator für 5 bis 7 Tage inkubiert. Die Zellen wurden mikroskopisch hinsichtlich zytotoxischer und zytopathogener Wirkung (CPE) beurteilt. Die Ergebnisse werden im
- 20 Absenkungsfaktor (Rf) zum Ausdruck gebracht. Der Absenkungsfaktor ist das Verhältnis der Konzentration der verbliebenen Viren zur ursprünglichen Viruskonzentration. Die Tests wurden dreimal ausgeführt. Die Ergebnisse, ausgedrückt in Rf werden in Tabelle 8 gezeigt.

25

30

Tabelle 8

Testgemisch	1/2	1/5	1/10	1/20	1/50
94A12	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
94D21	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
94D27	1	1	1	1	1
94E05	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>
Cetrimid 1%	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>

- Die obige Tabelle zeigt, dass die Testsalben eine viruzidale Aktivität bis zu einer Verdünnung 1/50 besitzen. Die viruzidale Aktivität ist vergleichbar mit der Aktivität von 1% Cetrimid. Das Placebo besitzt keine viruzidale Aktivität.

Beispiel 4

10

In vivo Aktivitätstest

15

Die Testgruppe bestand aus fünfzehn Patienten mit Fieberbläschen auf ihren Lippen. Sie wurden mit einer Salbe mit der folgenden Zusammensetzung behandelt:

20

PEG 400	52%
PEG 4000	26%
Glyzerol	9%
Cetrimid	1%
Cholin (gegebenenfalls)	2%
Cetylalkohol	1%
Kamillenextrakt	8%
Propylgallat	0,25%

25

Die Ergebnisse des Experimentes sind in der nachfolgenden Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Klinische Beurteilung der anti-HSV Aktivität der Testsalbe in vivo

Patient	Behandlung		Ergebnis		frühere Behandlung	Bemerkungen
	Häufig- keit	Dauer	Wirk- ung	welche Wirkung		
1	3x/Tag	1 Tag	Ja	keine Bläschenbildung	Zovirax	beim ersten Kribbeln verwendet
2	2x/Tag	1 Tag	Ja	keine Ausbreitung/ schnelle Heilung	Zovirax	--
3	4-5x /Tag	3 Tage	Ja	schnelle Heilung	Pâte hima	--
4	6/Tag	7 Tage	Ja	Bläschen trocknen schneller als zuvor	Zovirax	--
5	4-5x /Tag	3 Tage	Ja	schnelle Heilung	Zovirax	schmeckt schlecht
6	5/Tag	4-6 Tage	Ja	schnelle Wiederherstellung	Zovirax	--

7	2/Tag	2 Tage	Ja	keine Bläschenentwicklung	Nein	unbekannt	im Erkältungsfall vorbeugend verwendet
8	2/Tag	3 Tage	Ja	schnelle Heilung	Ja: Aus- trocknen	unbekannt	später keine weitere Wiederholung der Symptome / gewöhnlich > 1x pro Monat
9	3/Tag	4 Tage	Ja	schnelle Wiederherstellung	Nein	unbekannt	später weniger häufige Wiederholung der Symptome / nicht mehr in 4 Monaten
10	1/Tag	30 Tage	Ja	Keine Wiederholung der Symptome in 12 Monaten	Nein	unbekannt	Häufigkeit gewöhnlich > 1x pro Monat

11	2/Tag	4-5 Tage	Ja	schnelle Heilung	Nein	Vaseline	weniger häufige Wiederholung der Symptome
12	2-3/Tag	4 Tage	Ja	schnelle Heilung	Nein	Zovirax	--
13	3/Tag	4 Tage	Ja	schnelle Heilung/ keine Ausbreitung	Nein	Zovirax	weniger häufige Wiederholung der Symptome
14	2/Tag	3 Tage	Ja	schnelle Heilung/ keine Ausbreitung	Nein	Zovirax	weniger häufige Wiederholung der Symptome
15	3/Tag	4 Tage	Ja	schnelle Heilung/ keine Ausbreitung	Nein	Zovirax	wenn im Erkältungsfall vorbeugend verwendet; bei erstem Kribbeln → kein Ausbruch

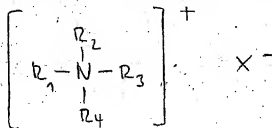
In einem zweiten Experiment mit zwei männlichen Patienten wurde die vorbeugende Wirkung der Salbe getestet. Zu diesem Zweck wurde die Salbe einmal pro Tag für sechs Monate an der Stelle aufgetragen, wo normalerweise ausgesprochene Läsionen auftraten. Das Ergebnis dieser Behandlung war, dass Wiederholungen der Symptome nicht länger auftraten, sogar in Erkältungsfällen. Vor der Behandlung hatte einer der zwei Patienten Fieberbläschen zumindest einmal pro Monat, während in beiden Patienten Erkältungen immer mit den Symptome einhergingen.

Die vorliegende Erfindung stellt eine neue pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung von Herpesinfektionen, insbesondere Gesichts- oder Mund-Herpes, verursacht durch HSV-1 oder -2, bereit. Der große Unterschied zu anderen Heilmitteln ist, dass die meisten Patienten, welche das Heilmittel kurierend oder vorbeugend anwenden, später Wiederholungen der Symptome an der gleichen Stelle nicht mehr haben.



Patentansprüche

1. Pharmazeutische Zusammensetzung für die Behandlung von Herpes Simplex Virusinfektionen, umfassend mindestens eine  
 5 quarternäre Ammoniumverbindung mit der Formel



10

- wobei  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  und  $R_4$  gleich oder verschieden sein können und eine aliphatische oder aromatische Gruppe darstellen, wobei mindestens eines von  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  oder  $R_4$  eine  
 15 aliphatische Kette von 8 oder mehr Kohlenstoffatomen ist, und wobei X ein anorganisches Anion mit niedrigerem Molekulargewicht oder ein organisches Anion mit hohem Molekulargewicht ist, und mindestens einen antiviralen Wirkstoff, welche zueinander kompatibel sind, in einer pharmazeutisch annehmbaren Basis.

20

2. Pharmazeutische Zusammensetzung, wie in Anspruch 1 beansprucht, die weiter einen Pflanzenextrakt umfasst, welcher imstande ist, die mit Herpes Simplex Virusinfektion einhergehenden Symptome von Schmerz und Entzündung zu  
 25 lindern.

25

3. Pharmazeutische Zusammensetzung, wie in Anspruch 1 oder 2 beansprucht, dadurch charakterisiert, dass die quarternäre Ammoniumverbindung aus der Gruppe ausgewählt ist,  
 30 die aus Cetrimid, Benzalkoniumchlorid besteht.

30

4. Pharmazeutische Zusammensetzung, wie in den Ansprüchen 1-3 beansprucht, dadurch charakterisiert, dass der antivirale

Wirkstoff aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Acyclovir, Bromvinylidesoxuridin (BVDU), 3-Fluorthymidin (3FT), Idoxuridin, Propylgallat, Ethylgallat, Proanthocyanide, Glucosamin besteht.

5

5. Pharmazeutische Zusammensetzung, wie in den Ansprüchen 2-4 beansprucht, dadurch charakterisiert, dass der antivirale Wirkstoff aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Aesculus hippocastanum L; Aloe vera L; Anagallis arvensis L; Anthemis nobilis L; Arctium lappa L; Aristolochia clematitis L; Arnica montana L; Betonica officinalis L; Calendula officinalis L; Capsicum annuum (tetragonum); Carica papaya L; Carlina acaulis L; Caryophyllus aromaticus L; Cynoglossum officinale L; Echinacea angustifolia; Echinacea purpurea L; Eupatorium cannabinum L; Geranium robertianum; Geum urbanum L; Glechoma hederacea L; Hamamelis virginiana L; Hypericum perforatum L; Inula helenium L; Juglans regia L; Juniperus oxycedrus L; Lavandula officinalis; Lawsonia alba L; Lysimachia nummularia L; Lythrum salicaria L; Malva sylvestris; Marrubium vulgare L; Matricaria chamomilla L; Mentha piperita L; Myroxylon balsamum L; Myrtus communis L; Olea europaea L; Prunus amygdalus; Pyrus cydonia L; Quercus robur L; Quillaja saponaria; Rubus idaeus L; Salvia officinalis L; Saponaria officinalis L; Smilax officinalis; Solanum dulcamara L; Solidago virga aurea L; Styrax tonkinensis; Styrax benzoides; Styrax benzoin; Symphytum officinale L; Trigonella foenum-graecum L; Tropaeolum majus L; Urtica urens L; Urtica dioica L; Viola tricolor L besteht.
- 10
- 15
- 20
- 25

30

6. Pharmazeutische Zusammensetzung, wie in den Ansprüchen 2-4 beansprucht, dadurch charakterisiert, dass der Pflanzenextrakt aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Extrakten der Kamille, Calendula, Salbei, Große Klette, Senna

in dem Fall besteht, dass die quarternäre Ammoniumverbindung Cetrimid ist.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung, wie in den Ansprüchen 2-4 beansprucht, dadurch charakterisiert, dass der Pflanzenextrakt aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Extrakten der Kamille, Calendula, Senna in dem Fall besteht, dass der erste Bestandteil Benzalkoniumchlorid ist.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung, wie in irgendeinem der Ansprüche 1-7 beansprucht, die
- 0,1-5% einer quarternären Ammoniumverbindung;
  - 0,01-3% eines antiviralen Wirkstoffes; und
  - 1-20% eines Pflanzenextraktes;
- in einem pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung, wie in Anspruch 8 beansprucht, die

	PEG 400	52%
20	PEG 4000	26%
	Glyzerol	9%
	Cetrimid	1%
	Cholin (gegebenenfalls)	2%
	Cetylalkohol	1%
25	Kamillenextrakt	8%
	Propylgallat	0,25%

umfasst.

10. Verwendung einer Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1-9 für die Zubereitung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung von HSV-1 Infektionen.

10.12.02

11. Verwendung einer Zusammensetzung nach irgendeinem der Ansprüche 1-9 für die Zubereitung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung von RSV-2 Infektionen.

## PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF HERPES

Publication number: DE69624340 (T2)

Publication date: 2003-06-18

Inventor(s): VAN DEN BERGHE ANDRE [BE]

Applicant(s): BIO PHARMA SCIENCES BV [NL]

Classification:

- International:

A61K45/00; A61N33/12; A61N37/02; A61K31/14;  
 A61K31/19; A61K31/195; A61K31/215; A61K31/52;  
 A61K31/70; A61K31/715; A61K36/14; A61K36/185;  
 A61K36/264; A61K36/28; A61K36/30; A61K36/36;  
 A61K36/38; A61K36/48; A61K36/482; A61K36/49;  
 A61K36/52; A61K36/53; A61K36/534; A61K36/537;  
 A61K36/61; A61K36/73; A61K36/736; A61K36/77;  
 A61K36/81; A61K36/86; A61K36/88; A61K36/90;  
 A61P31/12; A61P31/22; A61K45/00; A61N33/00; A61N37/02;  
 A61K31/14; A61K31/185; A61K31/21; A61K31/519;  
 A61K31/70; A61K31/715; A61K36/13; A61K36/185;  
 A61K36/88; A61P31/00; (IPC1-7): A61K35/78






- European:

A61K36/264; A61K36/14; A61K36/185; A61K36/28;  
 A61K36/30; A61K36/36; A61K36/38; A61K36/48; A61K36/482;  
 A61K36/49; A61K36/52; A61K36/53; A61K36/534;  
 A61K36/537; A61K36/61; A61K36/73; A61K36/736;  
 A61K36/77; A61K36/81; A61K36/86; A61K36/88; A61K36/90

Application number: DE19966024340T 19960123

Priority number(s): NL19950000216 19950206; WO1996NL00038 19960123

Also published as:

 WO9624367 (A1)  
 US6284289 (B1)  
 NL9600216 (A)  
 JP2008074872 (A)  
 JP10513193 (T)

more &gt;&gt;

Abstract not available for DE 69824340 (T2)

Abstract of corresponding document: WO 9624367 (A1)

The invention relates to a pharmaceutical composition for the treatment of herpes simplex virus infections, comprising a quaternary ammonium compound as a first component and/or an antiviral agent as a second component and/or a plant extract as a third component, wherein the three components are mutually compatible, in a pharmaceutically acceptable base.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

## PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF HERPES

The EPO does not accept any responsibility for the accuracy of data and information originating from other authorities than the EPO; in particular, the EPO does not guarantee that they are complete, up-to-date or fit for specific purposes.

Description of corresponding document: WO 9624367 (A1)

**PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF HERPES** The present invention relates to a pharmaceutical composition for the treatment of herpes.

Herpes simplex infection on the skin causes superficial painful spots and blisters, which eventually open, thereby causing lesions. Herpes is mainly caused by Herpes simplex virus (HSV) type 1, but can also be the result of HSV type 2 which usually causes genital herpes.

Conversely, genital herpes is caused in about 30% of cases by HSV 1.

Infections of the mouth are designated with the term herpes labialis, also called cold sore (feverblister).

Other parts of the face, such as eyes and nose, can also be affected. This is then referred to as facial herpes simplex. The infection can also manifest itself on other parts of the body.

About 70-90% of the population is primarily infected with HSV. These people are then carriers of the virus.

Once an individual has been infected with the HSV, this virus will thereafter remain latently present in the body. In latent state the virus is situated in nerve cell bodies in the ganglia. Due to particular stimuli, such as influenza infection or other respiratory disorders, gastro-intestinal infections, stress, fatigue, menstruation, pregnancy, allergy, sunlight and fever, the latent virus can be activated. It will travel from the ganglia along well-defined nerve paths to the skin surface and there multiply and cause the symptoms. This recurrent form of herpes occurs in about 40% of the infected individuals.

A per se reasonably innocuous herpes simplex infection can lead to much more serious infections, such as keratitis and encephalitis. It is therefore important that the virus niduses, at the location of the infection, are efficiently destroyed.

At the moment the most frequently used remedy against HSV infections is acyclovir, which is sold for instance under the brand name Zovirax. Acyclovir is a guanine analog which interferes with the DNA polymerase of the virus and thereby inhibits viral DNA replication.

The virus is prevented from multiplying but the virus itself is however not killed. The virus can therefore withdraw to the ganglia, thus resulting once again in latency.

Transmission of HSV-1 occurs through direct contact via saliva or the infected spot on the skin. This transmission is also not prevented by acyclovir.

Another problem is the occurrence of secondary bacterial infections, for instance impetigo, caused by staphylococci and/or streptococci.

On account of these problems of herpes infection, which may or may not be attendant, there is an obvious need for a pharmaceutical preparation which can diminish or even prevent the occurrence of latency as well as the transmission and secondary bacterial infections.

According to the present invention it has now been found that a pharmaceutical composition consisting of a quarternary ammonium compound as a first component and/or an antiviral agent as a second component and/or a plant extract as a third component, wherein the three components are mutually compatible, in a pharmaceutically acceptable base, can resolve the above stated problems.

In order to break the vicious circle of latency, recurrence and renewed latency of the virus, it is necessary to kill the virus itself. Less or even no latency can hereby recur in the case of primary or recurrent infection since the dead virus cannot withdraw into the ganglia. The most important component of the present composition according to the invention is therefore a virucidal substance whereby the virus is killed.

Antiviral agents can be subdivided into a number of categories (Colgate, S.M. & Molynieux, R.J., Bio-active natural products, 410, CRC Press, Inc. (1993)), designated with the classification group Ia to group Vb.

According to the invention it has now been found that, in order to deal with HSV infections to the fullest possible extent, preferably one or more substances from group IVb must be combined with one or more substances from group Va. Substances from group IVb exhibit virucidal activity, while compounds from group Va display virostatic and antiviral activity. By the combination of both types of substance the virus replication is inhibited and in addition the viruses already present are killed.

In order to ensure that the secondary infection of the lesion caused by HSV infection by other microorganisms such as bacteria is prevented, it is recommended that either the first component and/or the second component has disinfecting properties.

In order to alleviate the associated symptoms of pain and inflammation a plant extract is preferably also used. This extract preferably also has a soothing effect in addition to inflammation-inhibiting properties.

Products from group IVb which also have a disinfecting activity and can therefore be used in the pharmaceutical composition according to the invention can be selected in a manner known to the skilled person. Use is herein made of the end point titration technique (EPTT) as described by Colgate & Molynieux (supra, p.

413), with which the virucidal activity of a product can be tested. The activity is expressed in virus titre reduction which is determined in vitro by incubation of a herpes virus suspension with dilutions of the

product for testing at 370C for 5 minutes. A good product will give a minimal titre reduction of 103.

From a general screening of known disinfectants for their virucidal action against Herpes simplex type 1 and Herpes simplex type 2 strains (clinical isolates) it has been found according to the invention that a few products display very high activity, even at 250C. This is very advantageous because the temperature on the skin is generally lower than 370C and even lower than 340C. It has been found that the quaternary ammonium compounds cetrimide and benzalkonium chloride in a concentration of 50-200 bg/ml and 100-200 pg/ml respectively showed a titre reduction of at least 103 for a test period of 5 minutes at 250C. Other known disinfectants, such as alcohols, phenols, peroxides, biguanides, aldehydes, chlorine compounds etc. displayed an activity which was a minimum of five times lower. Only mercury compounds and determined heavy metal compounds have a better activity.

However, due to their high toxicity these compounds are not suitable for the intended application.

All quaternary ammonium compounds can in principle be used with the general formula: EM14.1

wherein R1, 4, R3, and R4 can be the same or different and represent an aliphatic or aromatic group, wherein at least one of R1, R2, R3 or R4 is an aliphatic chain of 8 or more carbon atoms; and wherein X is a low molecular weight inorganic anion or a high molecular weight organic anion. A survey of suitable quaternary ammonium compounds is given for instance by A. Dauphin & J.C. Darbort in "Hygiène hospitalière pratique", Editions medicales internationales, Paris (1988). Cetrimide is highly recommended.

Quaternary ammonium compounds are well soluble in water and alcohol but cannot be combined with any random other product. An important requirement for the second component is therefore that it must be compatible with the first component. Anionic products, soaps, nitrates, heavy metals, oxidizing products, rubber, proteins and the like are not compatible with quaternary ammonium compounds. Such products are therefore not suitable for use in the composition according to the invention. The second component is preferably not teratogenic and can be given in a high dosage without being toxic therein. In preference the second component further shows a good penetration of the skin.

As second component known antiviral products can be used, such as acyclovir, BVDU, 3FT, Idouridine etc., as long as they are compatible with the first component. In addition non-toxic natural products with antiviral activity can be used.

The suitability of the second component can likewise be tested with a per se known EPTT method (Colgate & BR< Moynaux, supra, p. 414). Use is herein made of VERO cells. According to the invention it has thus been found that gallates have a good antiviral activity in vitro.

Propyl gallate in a concentration of 100 Ag/ml thus has a titre reduction factor of 104. In a concentration of 25 pg/ml the reduction factor of the infectious particles in VERO cells is 103. Ethyl gallate has a reduction factor of 104 in a concentration of 100 pg/ml and of 102 at 25 Ag/ml. Ethyl gallate is therefore slightly less active.

The compatibility of the first component and the second component can be determined by testing a mixture of the two components on HSV-1. It has been found that a mixture of propyl gallate and cetrimide (2:1) in a concentration of 250 Ag propyl gal late to 125 pg cetrimide still has a virucidal action of 103 after a test period of 5 minutes at 250C. The same applies in the case of ethyl gallate and cetrimide. A mixture of cetrimide and BVDU or acyclovir continues to display an antiviral activity after dilution in vitro to 5 Mg/ml BVDU or acyclovir and 0.1 Mg/ml cetrimide.

The pharmaceutical composition preferably also contains a plant extract, with which the pain and effects of the inflammation reaction can be alleviated. Here it is also the case that the extract may not interfere with the activity of the first and the second component.

For this purpose various plant extracts were tested with cetrimide and propyl gallate or benzalkonium chloride and propyl gal late to see whether the virucidal activity is maintained and the components are compatible.

It has been found that extracts of camomile and Calendula remain useable in vitro. Extracts of Aloe vera, Echinacea root, tricolor violet, Senna, Melissa and/or Hawthorn are also capable of alleviating the inflammation reaction or pain while the virucidal activity is retained.

Particular plant extracts however cause a marked reduction in the virucidal activity of some quaternary ammonium compounds. It has for instance been found that 10% hamamelis completely deactivates the virucidal and antibacterial activity of benzalkonium chloride (0.5%).

The activity of 0.1% benzalkonium chloride against herpes and bacteria is reduced 4 to 8 times by sage and great burdock extract. However, a combination of cetrimide with a second component and a plant extract of camomile, Calendula, sage, great burdock and senna was found *An vitro* to remain active against Herpes simplex virus as well as bacteria.

The compatibility of the plant extract to be used must therefore be determined beforehand. Such a determination lies within the reach of the average skilled person.

Suitable plant extracts come for instance from *Aesculus hippocastanum* L; *Aloe vera* L; *Anaallis arvensis* L; *Anthemis nobilis* L; *Arctium lappa* L; *Aristolochia clematitis* L; *Arnica montana* L; *Betonica officinalis* L; *Calendula officinalis* L; *Capsicum annuum* (tetraodonum); *Carica papaya* L; *Carolina caulis* L; *Caryophyllus aromaticus* L; *Cynalosom officinale* L; *Echinacea angustifolia*; *Echinacea purpurea* L; *Eupatorium cannabinum* L; *Geranium robertianum*; *Geum urbanum* L; *Glechoma hederacea* L; *Hamamelis virginiana* L; *Hydericum Derforatum* L; *Inula helenium* L; *Jualans reach* L; *Juniper oxcedrus* L; *Lavandula officinalis*; *Lawsolia alba* L; *Lysimachia nummularia* L; *Lithrum salicaria* L; *Malva sylvestris*; *Marrubium vulgare* L; *Matricaria chamomilla* L; *Mentha DiDerita* L; *Myroxylon balsamum* L; *Mvrtus communis* L; *Olea euroDaes* L; *Prunus amygdalus*; *Pyrus cdonia* L; *Quercus robur* L; *Oullala saponaria*; *Rubus idaeus* L; *Salvia officinalis* L; *Saponaria officinalis* L; *Smilax officinalis*; *Solanum dukamara* L; *Solidago viras aurea* L; *Strax tonkinensis*; *Strax benzoides*; *Syrax benzon*; *Symphylum officinale* L; *Triponella foenum-araceum* L;

*Tropaeolum maius* L.; *Urtica urens* L.; *Urtica dioica* L.; *Viola tricolor* L.

The pharmaceutical composition according to the invention, which consists of a combination of one or more quaternary ammonium compounds with a virucidal and antiseptic activity and/or an antiviral product which is compatible with the quaternary ammonium compound and inhibits the virus replication, and/or a plant extract which is likewise compatible with both above mentioned products and alleviates the associated effects of the herpes infection such as pain, itching, swelling, tingling etc., provides a total treatment of herpes infection. The virucidal activity of the composition kills the viruses, whereby latency will occur less or not at all. The antiviral activity inhibits the virus replication and therewith the multiplying of the virus.

The antiseptic activity prevents secondary bacterial infections. Finally, the inflammation-inhibiting activity prevents inflammation and moreover soothes the pain and the itching.

The components of the composition according to the invention are preferably included in a pharmaceutically acceptable base. For the base also applies that it may not reduce the activity of the three components. In order to test whether a base is suitable, the virucidal activity of the first component and the disinfecting activity can be determined. The disinfecting activity is for instance determined in a manner lying within reach of the skilled person for a period of 5 minutes at 250C on Gram-negative germs, for instance of *Pseudomonas aeruginosa* or *Escherichia coli*.

Examples of suitable bases are polyethylene glycols in different molecular sizes or mixtures thereof, esters of fatty acids or mixtures thereof, whether or not mixed with emulsifying and/or skin-care constituents. Also suitable are mixtures of polyethylene glycols and/or esters of fatty acids with or without the emulsifying and/or skin-care constituents.

The pharmaceutical composition according to the invention can take the form of a powder, suspension, solution, spray, emulsion, unguent or cream and can be used for localized application. Such composition can be prepared by combining (i.e. mixing, dissolving etc.) the active components in the form of a free acid or salt with pharmaceutically acceptable excipients of a neutral character (such as aqueous or non-aqueous solvents, stabilizers, emulsifiers, detergents, additives) and in addition, where necessary, colorants, aromatic substances and/or flavourings. The concentration of the active ingredient(s) in a pharmaceutical composition can vary between 0.001% and 100% (w/v), depending on the nature of the treatment and the manner of application. An unguent is recommended.

The composition of the invention contains for instance 10-90% of a non-aqueous base, 1-20% of an alcohol, 0.1-5% of one or more quaternary ammonium compounds, and/or 0.01-2% of one or more antiviral agents, and/or 0.5-10% of one or more plant extracts. The quantity of plant extract used is closely related to the activity thereof and to the concentration of active constituents in the extract.

A preferred composition according to the invention contains 20-60%, preferably 52% PEG 400, 10-40%, preferably 26% PEG 4000, 2-20%, preferably 9% glycerol, 0.5-1.6%, preferably 1% cetrimide, 0.2-3%, preferably 1% cetyl alcohol, 5-15%, preferably 8% camomile extract and 0.2-1%, preferably 0.25% propyl gallate.

The present invention will be further elucidated with reference to the accompanying examples, which are however not intended to limit the invention in any way whatever.

**EXAMPLES** **EXAMPLE 1** Preparation of the anti-herpes preparation With the following ingredients: A. Polyethylene glycol 400 52 % Polyethylene glycol 4000 26 % Glycerol 9% Cetr imide 1 % Choline chloride (optional) 2 % Cetyl alcohol 1 % B. Camomile extract 8 % Propyl gal late 1 % an unguent was prepared by melting the ingredients under A at 75°C and dissolving the ingredients under B. The mixture of the ingredients under A obtained after melting was subsequently mixed homogeneously while being cooled slowly and the mixture of B was added before solidifying of the mixture of A. Mixing was then continued until the total mixture was fully cooled. The mixture was named 93J12.

Polyethylene glycol 400 and 4000 were obtained from Pharmaceuticals, which markets them under the trade names Macropol 400 - Purna and Macrogol 4000. Glycerol was of p.a. quality and came from Merck (4094), cetrimide A 11936 was supplied by Pharmachem NV, choline chloride (C1679) by Sigma. Cetyl alcohol is marketed under the brand name Lanette 16 by Henkel KGaA. The liquid camomile extract came from Conforma and propyl gallate P3130 from Sigma.

**II. Preparation and composition of M-VDB medium** With the following ingredients Sodium chloride (NaCl) 6.77 g D-galactose 0.80 g Sodium pyruvate 0.20 g Potassium chloride (KCl) 0.40 g Magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O) 2.0 g Calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) 0.20 g Sodium dihydrogen phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O) 0.14 g Sodium succinate 1.0 g Succinic acid 0.75 g L-Glutamine (+) 0.30 g Amino acids BME 1000 x 10 ml Vitamins BME 100 x 10 ml Phenol red stock solution 1 ml (i.e. 1% phenol red in an aqueous solution of 0.05N NaOH) a maintenance medium for cell cultures was prepared by dissolving everything in 960 ml distilled water, subsequently adjusting the pH to 7.4 with NaOH (10N) and filtering to sterile through a 0.2 membrane filter. 2% Newborn Calf Serum (for VERO cells) or 2% foetal calf serum (for other cells) was then added.

**EXAMPLE 2** Antiviral activity 1. Antiviral activity of the components In this example use was made of VERO cells which came from the American Type Culture Collection (accession number CCL 28). VERO cells were cultured in Medium 199 (Gibco) with Earle's salts and 5% calf serum. As virus source was used Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1, characterized clinical isolate), which was cultured in M VDB with 100 Zg/ml penicillin, 100 Zg/ml streptomycin and 2% calf serum.

On a monolayer of VERO cells cultured in microtitre plates (96 wells with flat bottom) was arranged 100 µl of a dilution series of 101 to 10<sup>-6</sup> of HSV-1 in M-VDB. The virus was allowed to adsorb to the cells for 80 to 90 minutes. A dilution series of the test product in M-VDB was then added to the infected cells. In order to check the cytotoxicity of the product the dilutions of the product were likewise added to non-infected cells. After the incubation at 37°C in a humid chamber for 5 days the cytopathogenic effect (CPE) was evaluated microscopically.

The antiviral activity of the product is expressed as the reduction factor (RF) of the highest non-toxic



concentration of the sample. The reduction factor (RF) is the ratio of the concentration of virus in the control compared to the concentration of living virus in the product dilutions. An RF of  $> 10^2$  is considered significant. The results of the experiment with propyl gallate are shown in table 1.

TABLE 1 Test Product Test concn-Reduction factor titration virus titre Propyl gallate dissolved in 100 µg/ml 104 DMSO and diluted in M-VDB idem 50 µg/ml 104 idem 25 µg/ml 103 idem 10 µg/ml I From the above can be seen that the antiviral activity of propyl gallate for HSV-1 is still significant up to a concentration of 25 µg/ml.

The virucidal activity was determined by mixing virus suspensions containing 106 cfu HSV-1 with an equal volume of the test product solutions in different concentrations. This mixture was incubated for a determined time at controlled temperature. A dilution series of 10-1 to 10-6 of each mixture was placed on a monolayer of VERO cells. After incubation for five days at 37°C the CPC was evaluated. The result was expressed in RF. Once again a titre reduction of # 102 was considered significant.

The results of the virucidal activity in respect of HSV-1 at 340C for 15 minutes are shown in table 2.

TABLE 2 Test Product Test concentration Reduction factor Propyl gallate 500 lg/ml 1 Ceramide 500 pg/ml 105 250 g/ml 105 125 ug/ml 105 100 g/ml 105 50 g/ml 10 10 pg/ml 1 Propyl gallate/Ceramide (211) 500/250 105 Propyl gallate/Ceramide (211) 250/1125 105 From the above can be seen that propyl gal late displays no virucidal activity and that Ceramide has virucidal activity up to a concentration of 100 g/ml.

The mixture of propyl gal late and Cetrimide retains its virucidal activity despite an excess of propyl gal late (2/1).

2. Antiviral properties of the test mixture In similar manner the antiviral activity of the test mixture prepared in example 1 was determined. The results of the virucidal activity of the unguent at 25°C for 15 minutes are shown in table 3.

Table 3 shows that the unguent still displays virucidal activity in respect of HSV-1 up to a dilution of 1/100 at 250C. The cetrimide thus retains its full activity, even at 250C.

TABLE 3 Test mixture Dilution RF 93J12 112 105 1/4 105 1/8 10S 1/16 105 1/32 105 1/64 105 1/128 105 1/256 1 EXAMPLE 3 Antibacterial activity The antibacterial activity of the separate components as well as the end product was determined with the test organisms *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). The media used were Tryptic Soy Broth (TSB), Tryptic Soy Agar (TSA) and Sterile Phosphate buffer (PBS).

I. Antibacterial activity of components and mixtures in order to determine the minimal inhibiting concentration (MIC) an overnight culture was prepared of each micro-organism in TSB at 37°C. A 1/2 dilution series was likewise made in TSB of the test products used. 100  $\mu$ l of each dilution was placed in a microtitre plate. The overnight cultures were diluted 1/1000 in TSB. Of each bacterial suspension 100  $\mu$ l was likewise added to the product dilutions. As controls for the sterility were used product dilutions without addition of bacteria and bacterial dilutions without addition of product dilutions. The microtitre plates were incubated for 24 h at 37°C. The bacterial growth was evaluated on the basis of the turbidity of the suspension. The MIC value is the lowest product concentration which can prevent the normal growth of a micro-organism, i.e. does not result in any turbidity.

The results are shown in table 4.

TABLE 4 Test Drotect % *Candida* *Escherichia* *Pseudomonas* *Staphylococcus* *albicans* *coli* *aeruginosa* *lococcus* *aurus* Camomile extract (w/v) = 25 > 25 > 25 12.5 % Propyl gallate (w/v) > 2 0.2 0.05 0.1 0.1 0.2 % Cetrimide (w/v) 0.001 0.003 0.003 0.0005 % Camomile 10 % - 1/128 - Cetrimide 05 % Camomile 5 % + Propyl gallate 0.2 % 1/512 1/128 1/128 1/1024 + Cammide 0.5 % The above shows that the camomile extract has a very limited antibacterial activity in respect of some microorganisms and only in high concentrations. Propyl gal late and cetrimide on the other hand have a significant antibacterial activity. In the mixtures cetrimide is found to retain its antibacterial activity.

II. Antibacterial activity of the test unguent Three separate portions of unguent were prepared, as described in example 1, which were given the lot numbers 94A12, 94D21 and 94E05. As placebo the same composition was prepared, with omission however of cetrimide. The placebo is designated with 94D27. As control was used 1% cetrimide in sterile distilled water. All test samples were stored at room temperature.

#### Ila. Determination of minimal inhibiting concentration (MIC).

The minimal inhibiting concentration is that concentration of the test product below which bacteria will no longer grow. The highest test concentration used (1/10 dilution) was prepared by suspending one gram of unguent in 9 ml sterile distilled water. The dilutions were added to the bacteria, which were then cultured for 24 hours. The used test organisms were *Candida albicans* (Ca), in a quantity of 105, 106 *Escherichia coli* (Ec), 105 *Pseudomonas aeruginosa* (Pa), and 106 *Staphylococcus aureus* (Sa).

Table 5 shows the dilution in which the growth of bacteria is inhibited.

TABLE 5 EMI15.1

Test mixture	Ca	Ec	Pa	Sa	
94A12	1/80	1/160	1/40	1/5120	
94D21	1/80	1/160	1/40	1/5120	
94D27	> 1/20	> 1/20	> 1/20	> 1/20	
94E05	1/80	1/160	1/40	1/5120	
Cetrimide	1%	1/80	1/320	1/40	1/5120

The table shows that all test unguents retain their antibacterial activities. The MIC of these unguents is comparable to the MIC value of 1% cetrimide in water. In the tested concentrations the placebo has no antibacterial activity.

11b. Determination of the bactericidal and fungicidal activity. The bactericidal activity is tested with *Candida albicans* (10), *Escherichia coli* (106), *Pseudomonas aeruginosa* (105) and *Staphylococcus aureus* (106). The bactericidal activity is determined in accordance with the specifications of the European Pharmacopoeia. These entail the product for testing being mixed with the micro-organism and incubated for a time, whereafter the mixture is diluted and it is determined at which of the dilutions growth of bacteria still occurs.

A dilution was prepared of each micro-organism up to an end concentration of 106 - 107 cfu. The unguents are tested undiluted and in a 1/2 and 1/10 dilution in sterile distilled water. To one gram of the unguent or its dilution 100 µl of a diluted inoculum was added and mixed. After 15 minutes incubation at 250C a 1/10 dilution series was prepared in TSB (Tryptic Soy Broth (Gibco)) from 100 mg of this mixture. Each dilution was plated out on TSA (Tryptic Soy Agar (Gibco)). The plates were incubated for 24 hours at 37 CC. As controls were used an untreated culture of the micro-organisms and 1% cetrimide in distilled water activity. After incubation all plates were evaluated for growth. The tests expressed in Reduction factor (Rf) were performed three times. The results are shown in table 6.

TABLE 6 EMI17.1

Test mixture	Ca(106)	Ec(106)	Pa(105)	Sa(105)
1/1 -105	-106	-105	-106	
94A12 1/2	-105	-106	-105	-106
1/10 -105	-106	-105	-106	
1/1 -105	-106	-105	-106	
94D21 1/2	-105	-106	-105	-106
1/10 -105	-106	-105	-106	
1/1 -105	-103	1	-10	
94D27 1/2	-105	-103	1	-10
1/10 -1	-1	1	1	
1/1 -105	-106	-105	-106	
94E05 1/2	-105	-106	-105	-106
1/10 -105	-106	-105	-106	
1/1 -105	-106	-105	-106	
Cet 1% 1/2				
1/10 -105	-106	-105	-106	

The table above shows that all test unguents also retain their bactericidal activity in dilutions. All bacteria were killed. The placebo was found to have a very limited bactericidal activity.

11c. Fungicidal activity. In order to determine the fungicidal activity test organisms *Epidermophyton floccosum* (RV 69635) and *Trichophyton rubrum* (RV58124) were used.

The fungicidal activity was determined in the same manner as the bactericidal activity.

For this purpose a dilution was prepared of each micro-organism up to an end concentration of 104 - 105 cfu. The unguents were tested undiluted and in a 1/2 and 1/10 dilution in sterile distilled water. To one gram of the unguent or its dilution 100 µl of a diluted inoculum was added and mixed. After 15 minutes incubation at 250C a 1/10 dilution series was prepared in SAB (Sabouraud Bouillon (Gibco)) from 100 mg of this mixture. Each dilution was plated out on SABA (Sabouraud Agar (Gibco)).

The plates were incubated for 5 days at 250C. As controls were used an untreated culture of the micro-organisms and 1% cetrimide in distilled water. After incubation all plates were evaluated for growth. The tests were performed three times. The results, expressed in Reduction factor (Rf), are shown in table 7.

TABLE 7 EMI18.1

Test mixture		Epidermophyton		Trichophyton
floccosum (103)		rubrum (101)		
94A12 102	104			
94D21 102	101			
94D27 10	102			
94E05 102	104			
Cetrimide 1%	102	101		

The table above shows that the test unguents retain their fungicidal activity, which is comparable to that of 1% cetrimide in distilled water. The placebo has a limited fungicidal activity.

11d. Virucidal activity. The virucidal activity was determined according to the micro-method described by D. Vanden Berghe et al. in "Methods in Plant Biochemistry", Vol. 6 "Assays for Bioactivity", p. 49-67, Academic Press Limited 1991. To 300 µl product dilutions was added 300 µl undiluted virus suspension. These mixtures were incubated for 15' at 340C. Dilution tubes were provided with 0.9 ml cooled culture medium for virus and placed in an ice bath. 100 µl of the incubated mixtures was placed in the dilution tubes. A 1/10 dilution series was prepared therefrom. 200 µl of these dilutions was placed on the VERO cells.

Controls were untreated virus (= virus control) and untreated cells (= cell control). The plates were incubated at 370C in a humid incubator for 5 to 7 days.

The cells were evaluated microscopically for cytotoxic and cytopathogenic effect (CPE). The results are expressed in Reduction factor (Rf). The reduction factor is the ratio of the concentration of residual virus to the initial virus concentration. The tests were performed three times. The results expressed in Rf are shown in table 8.

TABLE 8 EMI19.1

Test mixture	1/2	1/5	1/10	1/20	1/50
--------------	-----	-----	------	------	------

94A12 105 105 105 105 105  
 94D21 105 105 105 105 105  
 94D27 1 1 1 1 1  
 94E05 105 105 105 105 105  
 Cetrimide 1% 105 105 105 105 105

The table above shows that the test unguents have a virucidal activity up to the dilution 1/50. The virucidal activity is comparable to the activity of 1% cetrimide.

The placebo has no virucidal activity.

EXAMPLE 4 In vivo activity test The test group consisted of fifteen patients with cold sores on their lips. They were treated with an unguent with the following composition: PEG 400 52% PEG 4000 26% glycerol 9% cetrimide 1% choline (optional) 2% cetyl alcohol 1% camomile extract 8% propyl gallate 0.25% The results of the experiment are given in the following table 9.

TABLE 9: CLINICAL EVALUATION OF ANTI-HSV ACTIVITY OF THE TEST UNGUENT IN VIVO EM20.1

Patient	Treatment	Result	earlier	Remarks
frequency	duration	effect	which	sideeffect effect
1 5x / day	1 day	yes	blisters	do not develop no
2 2x / day	1 day	yes	no spreading/	tingling Zovirax used at first tingling
3 4-5x /day	3 days	yes	rapid healing	no pâte hime -4 6 / day 7 days yes
blisters	dry faster	than no	Zovirax	-previously
5 4-5 / day	3 day	yes	rapid healing	no Zovirax tastes bad
8 5 / day	4-6 days	yes	quick recovery	no Zovirax -7 2 / day 2 days yes
blisters	do not develop	no unknown	used	preventively in case of cold
8 2 / day	3 days	yes	rapid healing	yes: unknown no further repetition of
symptoms	latdrying out	er/used to be	> 1x per month	
9 3 / day	4 days	yes	quick recovery	no unknown less frequent repetition of
symptoms	later/no more	in four months		
10 1 / day	30 days	yes	no repetition of	symptoms no unknown frequency used
to be	> 1x per month			
in 12 months				
11 2 / day	4-5 days	yes	rapid healing	no vaseline less frequent repetition of
symptoms				
12 2-3 / day	4 days	yes	rapid healing	no Zovirax -13 3 / day 4 days yes
rapid healing/	no Zovirax	less frequent	repetition of	symptoms
no spreading				
14 2 / day	3 days	yes	rapid healing/	no Zovirax less frequent repetition to
Symptoms				
no spreading				
15 3 / day	4 days	yes	rapid healing/	no Zovirax if used preventively in case of
cold;				
no spreading	at first tingling	#	no outbreak	

In a second experiment with 2 male patients the preventive action of the unguent was tested. To this end the unguent was applied once a day for six months at the location where normally speaking lesions occurred. The result of this treatment was that repetitions of the symptoms no longer occurred, even in cases of colds.

Prior to the treatment one of the two patients had cold sores at least once a month, while in both patients colds were always accompanied by symptoms.

The present invention provides a new pharmaceutical composition for the treatment of herpes infections, in particular facial or labial herpes caused by HSV-1 or -2.

The great difference from other remedies is that most patients who use the remedy curatively or preventively no longer have repetitions of the symptoms later in the same location.

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

## PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF HERPES

The EPO does not accept any responsibility for the accuracy of data and information originating from other authorities than the EPO; in particular, the EPO does not guarantee that they are complete, up-to-date or fit for specific purposes.

Claims of corresponding document: WO 9624367 (A1)

### CLAIMS

1. Pharmaceutical composition for the treatment of herpes simplex virus infections, comprising a quaternary ammonium compound as a first component and/or an antiviral agent as a second component and/or a plant extract as a third component, wherein the three components are mutually compatible, in a pharmaceutically acceptable base.
2. Pharmaceutical composition as claimed in claim 1, characterized in that the first component is chosen from the group consisting of cetrimide, benzalkonium chloride.
3. Pharmaceutical composition as claimed in claim 1 or 2, characterized in that the second component is chosen from the group consisting of acyclovir, bromovinyldeoxyuridine (BVDU), 3-fluorothymidine (3FT), idoxuridine, propyl gallate, ethyl gallate, proanthocyanidines, glucosamine.
4. Pharmaceutical composition as claimed in claim 1, 2 or 3, characterized in that the third component is chosen from the group consisting of extracts of *Aesculus hippocastanum* L; *Aloe vera* L; *Arnica montana* L; *Artemisia nobilis* L; *Arctium lappa* L; *Aristolochia clematitis* L; *Amica montana* L; *Betonica officinalis* L; *Calendula officinalis* L; *Capsicum annuum* (tetraponum); *Carica papaya* L; *Carlinia aculeata* L; *Carviolus aromaticus* L; *Cynolobos officinale* L; *Echinacea anastatifolia*; *Echinacea purpurea* L; *Eupatorium cannabinum* L; *Geranium robertianum*; *Geum urbanum* L; *Glechoma hederacea* L; *Hamamelis virginiana* L; *Hypericum perforatum* L; *Inula helenium* L; *Jalisco resia* L; *Juniperus oxycedrus* L; *Lavandula officinalis*; *Lawsonea alba* L; *Lysimachia nummularia* L; *Lyrithum salicaria* L; *Malva sylvestris*; *Marrubium vulgare* L; *Matricaria chamomilla* L; *Mentha piperita* L; *Myroxylon balsamum* L; *Myrtus communis* L; *Olea europaea* L; *Prunus amygdalus*; *Pyrus cydonia* L; *Quercus robur* L; *Quillaia saponaria*; *Rubus idaeus* L; *Salvia officinalis* L; *Sanonaria officinalis* L; *Smilax officinalis*; *Solanum dulcamara* L; *Solidago virga aurea* L; *Styrax tonkinensis*; *Styrax benzoides*; *Styrax benzoin*; *Symphytum officinale* L; *Trigonella foenum-graecum* L; *Tropeaeolum madagascariense* L; *Urtica urens* L; *Urtica dioica* L; *Viola tricolor* L.
5. Pharmaceutical composition as claimed in claim 1, 2 or 3, characterized in that the third component is chosen from the group consisting of extracts of camomile, *Calendula*, sage, great burdock, *Senna* in the case the first component is cetrimide.
6. Pharmaceutical composition as claimed in claim 1, 2 or 3, characterized in that the third component is chosen from the group consisting of extracts of camomile, *Calendula*, *Senna* in the case the first component is benzalkonium chloride.
7. Pharmaceutical composition as claimed in any of the claims 1-6, comprising: 0.1-5% of a quaternary ammonium compound; 0.01-3% of an antiviral agent; and 1-20% of a plant extract, in a pharmaceutically acceptable carrier.
8. Pharmaceutical composition as claimed in claim 7, comprising: PEG 400 52% PEG 4000 26% glycerol 9% cetrimide 1% choline (optional) 2% cetyl alcohol 1% camomile extract 8% propyl gallate 0.25% 9. Use of a pharmaceutical composition as claimed in any of the claims 1-8 for the treatment of HSV-1 infections.
10. Use of a pharmaceutical composition as claimed in any of the claims 1-8 for the treatment of HSV-2 infections.

---

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide